第7卷 第2期
1986年5月

动 物 学 研 究
ZOOLOGICAL RESEARCH

Vol. 7, No. 2
May, 1986

血红蛋白种间分子杂交以及树鼩进化地位的探讨

章 蓓 刘祖洞

(复旦大学遗传学研究所 上海)

摘 要

为了探讨树鼩(*Tupaia belangeri chinensis*)的分类地位及其与灵长类动物的亲缘关系，本文利用血红蛋白种间分子杂交技术，以人类血红蛋白HbA为标准，分析比较了树鼩血红蛋白与原始灵长类动物懒猴(*Nycticebus coucang*)血红蛋白的结构异同。在碱性条件下，三种血红蛋白的电泳迁移率大小为：人＞懒猴＞树鼩。树鼩Hb (α_2^{TuD}和β_2^{TuD}) 和HbA ($\alpha_2^{A}\beta_2^{A}$) 杂交可以产生两种杂种分子 ($\alpha_2^{TuD}\beta_2^{A}$和$\alpha_2^{A}\beta_2^{TuD}$) 。HbA和懒猴Hb ($\alpha_2^{NyC}\beta_2^{NyC}$) 杂交也可产生两种杂种分子($\alpha_2^{NyC}\beta_2^{A}$和$\alpha_2^{A}\beta_2^{NyC}$)。结果表明，树鼩Hb与懒猴Hb的α链净电荷相似。认为树鼩与懒猴的分类地位相近。

关键词：树鼩 血红蛋白

树鼩 (*Tupaia belangeri chinensis*) 在体型上兼有食虫目和灵长目动物的特征，它的分类学地位一直存在争议。近年来，随着比较生物学，生物化学和分子生物学技术的发展以及对树鼩头骨、神经解剖学和免疫等研究的深入，越来越多的学者接受了树鼩是原始灵长类动物的观点 (Luckett, 1980) 。在灵长目动物中确定树鼩的地位对于生物进化和灵长目动物起源等问题的探索具有重大意义。血红蛋白的研究可以为此提供证据。本文利用血红蛋白分子通过肽链的解离和重组合而产生杂种分子的特性，进行人—树鼩、树鼩—懒猴 (*Nycticebus coucang*)，人—懒猴的血红蛋白分子杂交，根据生成的杂种分子的特点，分析比较树鼩和原始灵长类动物懒猴的血红蛋白分子结构，探讨树鼩的分类地位及其与灵长类动物的亲缘关系。

---

* 本文实验工作在中国科学院昆明动物研究所完成，得到该所施立明、李靖炎、钟金颜老师的帮助，特此致谢。

** 血红蛋白分析技术得到上海市儿童医院医学遗传学研究室曾溢滔、黄淑帧老师指导，也一并致谢。

本文1985年4月8日收到，1985年7月30日收到修改稿。

材 料 与 方 法

一、材料　成年树鼩在云南昆明附近农村捕捉。人血采自健康成人。懒猴血采自昆明动物研究所动物房。

二、方法（参见曾溢滔等，1979；Huisman等，1977）。

（一）血红蛋白溶液的制备　血液标本经ACD保养液抗凝处理后，用生理盐水洗涤红血球四次，按红血球压积加入等体积的蒸馏水和1/2体积的四氯化碳，振荡溶血，离心取上清血红蛋白溶液，并调节至5％的溶度。

（二）血红蛋白的醋酸纤维素薄膜电泳　用pH8.5 TEB连续系统进行电泳，以确定三种血红蛋白的电泳迁移率。

（三）肽链的解离　取0.2毫升5％树鼩Hb溶液和0.2毫升5％HbA溶液，混合后置玻璃纸透析袋内，在4°C下对250毫升醋酸缓冲液（pH4.7）透析36小时，使肽链充分解离。

（四）肽链的重组合　将上述解离得的Hb肽链，连同透析袋一起移至预冷的200毫升TEB缓冲液（pH8.6）中，在4°C下透析16小时（中间更换一次缓冲液），使肽链重新组合。

（五）杂交产物的电泳分析　在碱性条件下（pH8.6，硼酸-NaOH、缓冲液）进行醋酸纤维素薄膜电泳（电压320V，电泳时间为15分钟），分析生成的杂种分子。

（六）按上述方法（三）至（五）再进行树鼩—懒猴，人—懒猴的血红蛋白种间分子杂交。

结　果

一、树鼩、懒猴、人的Hb的电泳图谱见图1。

二、树鼩—人，懒猴—人，树鼩—懒猴的Hb分子杂交的结果见图2—4。

树鼩Hb（$\alpha_2^{Tup}\beta_2^{Tup}$）—HbA分子杂交产物的电泳图谱（图2）显示，在杂交产物中，除了原有的两种Hb分子外，还可以发现两种杂种Hb分子，即$\alpha_2^{Tup}\beta_2^{A}$和$\alpha_2^{A}\beta_2^{Tup}$。HbA—懒猴Hb（$\alpha_2^{Nyc}\beta_2^{Nyc}$）杂交产物的电泳图谱（图3）中也可以发现两种杂种分子，即$\alpha_2^{Nyc}\beta_2^{A}$和$\alpha_2^{A}\beta_2^{Nyc}$。树鼩Hb—懒猴Hb杂交产物的电泳分析未显示杂种分子生成（图4）。

讨　论

在碱性条件下，三种血红蛋白的电泳迁移率为：人＞懒猴＞树鼩（图1），表明这三种血红蛋白的理化性质不同，它们的分子带电状态不同，它们的一级结构存在差异。由于HbA、懒猴Hb、树鼩Hb在电泳中可以依据迁移率不同而互相区别，同时，这三种Hb又都是由α链和β链所组成的四聚体，因此，可以通过血红蛋白种间分子杂交试验

进一步研究。

血红蛋白种间分子杂交是指血红蛋白分子在一定条件下通过肽链的解离和重新组合而产生新的杂种分子。Itano等人（1959）报道了人的血红蛋白和狗血红蛋白的种间分子杂交，Viaograd等（1960）应用同位素标记等技术研究了血红蛋白分子杂交的机制，认为Hb分子在酸性条件下首先解离为两个相同的半分子（$2\alpha\beta$），然后再进一步解离为1/4分子（α和β），在中性或碱性溶液中，这些1/4分子又重新组合成新的分子。在新形成的杂种分子的电泳区带中，Itano等（1959）根据N端的氨基酸顺序决定人的血红蛋白的α链和β链，并根据狗血红蛋白与人的α链和β链的构象相似性确定生成的杂种分子分别是$\alpha_2^A\beta_2^{犬}$和$\alpha_2^{犬}\beta_2^A$。参照Itano的分析方法，树鼩Hb（$\alpha_2^{Tup}\beta_2^{Tup}$）和HbA（$\alpha_2^A\beta_2^A$）的种间分子杂交可以表示为：

$$2\alpha_2^A\beta_2^A \xrightarrow{解离} 4\alpha^A\beta^A \xrightarrow{再解离} 4\alpha^A + 4\beta^A$$

$$2\alpha_2^{Tup}\beta_2^{Tup} \xrightarrow{解离} 4\alpha^{Tup}\beta_2^{Tup} \xrightarrow{再解离} 4\alpha^{Tup} + 4\beta^{Tup}$$

$$\xrightarrow{重组合} \alpha_2^A\beta_2^A + \alpha_2^{Tup}\beta_2^{Tup} + \alpha_2^A\beta_2^{Tup} + \alpha_2^{Tup}\beta_2^A$$

从图2（1）可见，在正常成人溶血液和树鼩Hb杂交产物的电泳图谱中，除了原来的人的Hb和树鼩Hb区带外，还可发现两条新的Hb区带，一条在HbA区带的前方，另一条在树鼩Hb区带的后面。根据Robinson等（1960）的狗Hb和HbA的种间分子杂交产物的电泳图谱，可以认为这是HbA($\alpha_2^A\beta_2^A$)与树鼩Hb($\alpha_2^{Tup}\beta_2^{Tup}$)杂交后形成的两种种间杂种分子，前者为$\alpha_2^{Tup}\beta_2^A$，后者为$\alpha_2^A\beta_2^{Tup}$。据 Maita 等（1977）报道，树鼩Hb的一级结构中，α链有27个氨基酸，β链有26个氨基酸与HbA不同。然而，树鼩Hb和HbA杂种分子的生成表明，尽管这两种Hb在氨基酸组成上有较大差异，它们的亚单位表面构象具有一定的相似性。

图3表明，懒猴Hb与HbA杂交也能产生杂种分子，分别为$\alpha_2^{Nyc}\beta_2^A$和$\alpha_2^A\beta_2^{Nyc}$（图3（1））。比较图2和图3可以发现，树鼩Hb的α链与人β链的杂交产物$\alpha_2^{Tup}\beta_2^A$和懒猴Hb的α链与人β链的杂交产物$\alpha_2^{Nyc}\beta_2^A$的电泳迁移率相似，它们都位于HbA的前面，且对HbA的相对迁移距离也近似。由于这两个杂种分子分别由两种α链和一种人的β链杂交而成，说明这两种α链的净电荷相同或相近，在结构上相似，即$\alpha^{Tup}=\alpha^{Nyc}$。同时，可以发现树鼩Hb的$\beta$链与人$\alpha$链的杂交产物$\alpha_2^A\beta_2^{Tup}$和懒猴Hb的$\beta$链与人$\alpha$链的杂交产物$\alpha_2^A\beta_2^{Nyc}$的电泳迁移率不同，虽然它们都在HbA的后面，但对HbA的相对迁移距离不同，$\alpha_2^A\beta_2^{Tup}$的迁移率明显慢于$\alpha_2^A\beta_2^{Nyc}$。这说明树鼩Hb的β链与懒猴Hb的β链的带电状态不同。根据以上结果，我们认为，树鼩Hb与懒猴Hb的结构差异主要在于其β链，而这两种α链的结构具有相当高的相似性。

为了证实以上结果，我们还进行了树鼩Hb与懒猴Hb的种间分子杂交试验，结果见图4。在图4（1）中，除了相应于树鼩Hb和懒猴Hb的两条电泳区带外，未见新的区带出现。曾溢滔（1974）曾经报道过，在人的异常血红蛋白与狗血红蛋白分子杂交过程中，由于杂种分子形成沉淀而未能在电泳系统中检测出来，我们在实验过程中，未观察到杂交混合液中有沉淀出现。Bangham（1957）曾观察到某些Hb分子在pH4.7条件下不解离的现象，但根据图2和图3的结果，可以看出树鼩Hb和懒猴Hb对HbA的亲和力相

似，在pH4.7的条件下，这两种Hb解链较完全，形成杂种分子的产率也较一致，因此，可以排除由于亲和力不同，解离不完全或者杂种分子沉淀而造成没有检测到杂种分子的可能性。事实上，当两种血红蛋白分子杂交时，若它们只有一条肽链存在差异，即使发生了解离和重组合，在电泳条件下也不能检测出来(Singer等，1959；Itano，1958)。我们认为，在杂交反应过程中，树鼩Hb和懒猴Hb发生了解离和重新组合，但是，由于这两种Hb分子的α链的电荷是相同的，在电泳过程中，杂种分子$\alpha_2^{Nvo}\beta_2^{Tup}$和$\alpha_2^{Tup}\beta_2^{Nvo}$分别与树鼩Hb($\alpha_2^{Tup}\beta_2^{Tup}$)和懒猴Hb($\alpha_2^{Nvo}\beta_2^{Nvo}$)重叠而未能检测出来。这个结果，证实了树鼩Hb和懒猴Hb只有一条肽链（β链）所带电荷不同，表明这两种血红蛋白在结构上具有很大的相似性。当然，这个结果可以用同位素标记技术进一步证实。

一般认为，进化上分歧年代越早，血红蛋白的组成差异越大。Hb种间分子杂交的结果为确立树鼩的进化地位提供了有力的证据，表明树鼩与懒猴的进化上的亲缘关系较近，可以认为树鼩是一种原始的灵长类动物。

参考文献

曾溢滔 1974 科学通报 19:238—240

曾溢滔等 1979 上海医学 2(7):66—67

Bangham, A. D., 1957 *Nature* 179:467—468

Huisman, T. H. J., 1977 The Haemoglobinapathies, Dekker New York

Itano, H. A., 1958 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 44:522—536

Itano, H. A. *et al.*, 1959 *Nature* 184:1468—1469

Luckett, W. P., 1980 Comparative Biology and Evolutionary Relationship of Tree Shrews, Plenum Press, New York

Maita, T. *et al.*, 1977 *J. Biochem.* 82:693—695

Robinson, E. A. *et al.*, 1960 *Nature* 187:798—799

Singer, S. J. *et al.* 1959 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 45:174—184

Viaogrcd, J. *et al.* 1960 *Nature* 187:216—218

THE EVOLUTIONARY RELATIONSHIP OF TUPAI AS VIEWED FROM THE INTERSPECIFIC MOLECULAR HYBRIDIZATION OF HEMOGLOBIN

Zhang Bei　Liu Zudong

(Institute of Genetics, Fudan University Shanghai)

The evolutionary relationship of tupai (*Tupaia belangeri chinensis*) was studied through interspecific molecular hybridization of the hemoglobins between tupai and human, tupai and loris (*Nycticebus coucang*) as well as human and loris. The Rf values of electrophoresis of the Hb in pH 8.6 were found to be as follows: human>loris>tupai. The results of interspecific molecular hybridization between tupai Hb ($\alpha_2^{Tup}\beta_2^{Tup}$) and human adult hemoglobin (HbA) ($\alpha_2^A\beta_2^A$) showed that, besides the two Hb molecules just mentioned, two other Hb molecules, the hybrid Hb molecules $\alpha_2^{Tup}\beta_2^A$ and $\alpha_2^A\beta_2^{Tup}$, were found. The hybridization between HbA and the Hb of loris ($\alpha_2^{Nyc}\beta_2^{Nyc}$) could also form two hybrid Hb molecules, $\alpha_2^{Nyc}\beta_2^A$ and $\alpha_2^A\beta_2^{Nyc}$. These results suggest that the α-chain of tupai is similar to that of loris Hb in net electric charge and hence substantiate the viewpoint that tupai may be considered as one of the primitive primate species.

Key words: Tupai Hemoglobin

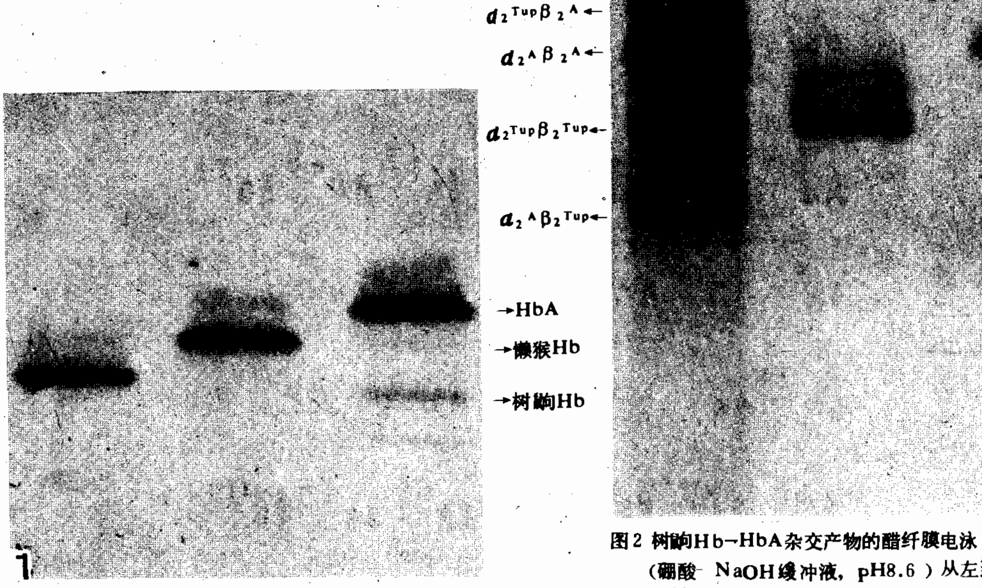


图1 树鼩，人，懒猴的Hb电泳图谱（显示三种Hb电泳迁移率的差异）(Tris—缓冲液，pH 8·5）从左到右：

（1）树鼩Hb溶液（10%）

（2）懒猴Hb溶液（10%）

（3）HbA溶液（10%）

图2 树鼩Hb－HbA杂交产物的醋纤膜电泳（硼酸－NaOH缓冲液，pH8.6）从左到右：

（1）树鼩Hb和HbA杂交液

（2）树鼩Hb（$\alpha_2^{Tup}\beta_2^{Tup}$）

（3）HbA（$\alpha_2^{A}\beta_2^{A}$）

$\alpha_2^{Nyc}\beta_2^{A}$ ←
$\alpha_2^{A}\beta_2^{A}$ ←
$\alpha_2^{Nyc}\beta_2^{Nyc}$ ←
$\alpha_2^{A}\beta_2^{Nyc}$ ←
3

图3 懒猴Hb—HbA杂交产物的醋纤膜电泳（硼酸－NaOH缓冲液、pH8.6）从左到右：

（1）懒猴Hb和HbA杂交液

（2）懒猴Hb（$\alpha_2^{Nyc}\beta_2^{Nyc}$）

（3）HbA（$\alpha_2^{A}\beta_2^{A}$）

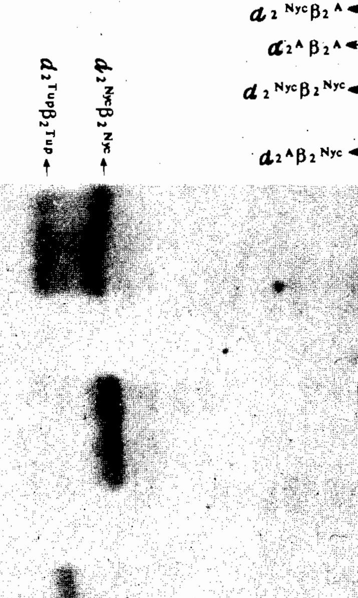


图4 树鼩Hb－懒猴Hb杂交产物的醋纤膜电泳（硼酸－NaOH缓冲液，pH8.6）从左到右：

（1）树鼩Hb与懒猴Hb的杂交液

（2）懒猴Hb（$\alpha_2^{Nyc}\beta_2^{Nyc}$）

（3）树鼩Hb（$\alpha_2^{Tup}\beta_2^{Tup}$）